

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

PIBIC - Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

**PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS PARA POTÁSSIO NO EFEITO
VASORRELAXANTE DE R (+) -PULEGONA EM RATOS NORMOTENSOS**

Área do conhecimento: Biofísica Celular

Laboratório de Biologia Cardiovascular e Estresse Oxidativo (LaBCEO)

Bolsista: Maria Iolanda Amaral Maia

iolandamaia1996@gmail.com

Orientadora: Sandra Lauton Santos

sandralauton@gmail.com

Relatório Final

Período: Julho/2017

RESUMO

A hipertensão arterial é uma doença que acomete principalmente idosos devido às mudanças morfofuncionais provocadas pela idade e tem se tornado um grande problema de saúde pública. A R(+)-pulegona é um monoterpeneo presente no óleo de *Mentha piperita* com atividade vasodilatadora. Utilizou-se anéis de aorta torácica sem endotélio funcional de ratos wistar para testes de reatividade vascular. Foi investigada a participação de canais para potássio sensíveis à voltagem (Kv), sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e dos sensíveis ao cálcio de grande condutância ($BK_{Ca^{2+}}$) incubando-se as preparações com os bloqueadores TEA – 1 mM e 3 mM, GLIB (10 μ M) e 4-AP (1mM). Utilizou-se FEN para induzir contração e concentrações crescentes de R(+)-pulegona (10^{-12} - 3×10^{-3} M) foram adicionadas à preparação. Os resultados demonstram a comparação entre o valor pD_2 e $E_{m\acute{a}x}$, assim, na presença dos bloqueadores, TEA 3mM ($-3,00 \pm 0,012$ vs $-3,17 \pm 0,034$), E_{max} ($98,4 \pm 0,6\%$ vs $106 \pm 8,1\%$); 4-AP ($-2,93 \pm 0,012$ vs $-3,17 \pm 0,034$ – $n=6$) E_{max} ($97,1 \pm 1,5\%$ vs $\pm 8,1$); GLIB ($-2,94 \pm 0,01$ vs $-3,17 \pm 0,03$) E_{max} ($96,4 \pm 1,2\%$ vs $106 \pm 8,1\%$). Tais resultados indicaram atividade vasorrelaxante sem divergir o E_{max} . Já o TEA 1 mM (PD_2 $-3,08 \pm 0,02$ e E_{max} $96,4 \pm 1,3\%$ vs veículo PD_2 $-3,17 \pm 0,03$ e E_{max} $106 \pm 8,2\%$), indicando não participar da atividade vasorrelaxante de R(+)-pulegona. Concluímos que os canais para potássio analisados participam do efeito vasorrelaxante induzido por R(+)-pulegona, mediante o efluxo de K^+ com exceção dos canais $BK_{Ca^{2+}}$.

1. Introdução

A hipertensão arterial é uma doença multifatorial que acomete principalmente as pessoas idosas devido ao enrijecimento dos vasos sanguíneos. Há ainda a possibilidade de expansão dos danos do compartimento cardíaco, podendo chegar ao cérebro, rins e vasculatura periférica. (PASSOS, *et al.*2006)

A hipertensão arterial é doença cardiovascular que mais leva ao óbito tornando-se um dos problemas de saúde pública mais comum e preocupante. No Brasil esta doença atinge 30% da população adulta e pode acometer mais de 50% da população na terceira idade e 5% das crianças e adolescentes. Os valores pressóricos elevados são responsáveis por 40% dos infartos, 80% dos acidentes vasculares cerebrais (AVC) e 25% dos casos de insuficiência renal terminal (SBH, 2016).

Um indivíduo é considerado clinicamente hipertenso quando apresenta pressão arterial sistólica igual ou superior a 140 mmHg e a diastólica alcança níveis superiores a 90 mmHg. O primeiro valor significa pressão máxima, onde ocorre a máxima contração, sístole, e o segundo significa a pressão mínima, onde ocorre a máxima dilatação, diástole (SBH, 2016).

Existem inúmeros medicamentos anti-hipertensivos no mercado, os quais diferem apenas no alvo molecular, potência e eficácia; são eles: diuréticos, α -bloqueadores, β -bloqueadores, bloqueadores de canais para cálcio, inibidores da ECA (Enzima Conversora de Angiotensina), bloqueadores do receptor AT1 (angiotensina 1) e vasodilatadores diretos. O tratamento da HAS pode ser realizado por administração de um único fármaco (monoterapia) ou a administração de dois ou mais medicamentos, diferindo apenas sua classe farmacológica. Esses fármacos são administrados de acordo com a manifestação clínica da doença no paciente, o que remete à variação interpessoal.

Neste contexto, um fato que merece destaque é que apenas 23% dos hipertensos seguem o tratamento recomendado corretamente, 36% dos pacientes não seguem o tratamento e assim, não controlam de nenhuma maneira a pressão arterial e 41% dos pacientes diagnosticados abandonam o tratamento após a melhora inicial do tratamento (SBH, 2016). Um importante fator a ser destacado como causa para a não adesão ao tratamento é a grande quantidade de efeitos colaterais provocado pelo uso do medicamento, fato que impulsiona o desenvolvimento de alternativas terapêuticas que

favoreçam a continuidade do tratamento de paciente com hipertensão. Fontes moleculares para o desenvolvimento destes fármacos são, sem dúvida, as encontradas em espécimes da nossa fauna e flora. Assim, destacam-se as plantas medicinais com potenciais farmacológicos para o tratamento dessa patologia, tendo em vista que a utilização das mesmas com finalidade terapêutica, baseada no conhecimento popular, é utilizada desde a antiguidade.

O uso da terapia alternativa e complementar tem crescido em todo o mundo, pois, assim como os medicamentos sintéticos, as plantas podem ser utilizadas para alcançar a cura ou conter o rápido avanço de alguma patologia. Os usuários indicam que o custo e a viabilidade são os principais fatores para a utilização das plantas medicinais, mas por ser natural não exclui a possibilidade de ocorrer efeitos colaterais e reações adversas. Diante do exposto, é de suma importância que os usuários tenham contato com algum profissional da saúde (médico ou farmacêutico) para auxiliar nas instruções de uso para reduzir os efeitos colaterais que a utilização desta terapia pode oferecer. (ALISHTAYEH *et. al.*, 2013).

Para ratificar o conhecimento popular, descrevendo o(s) princípio(s) ativo(s) responsável(veis) pelo efeito terapêutico observado de forma a disponibilizar alternativas seguras para o tratamento de pacientes hipertensos é necessário realizar diversos tipos de estudos experimentais com tais produtos naturais extraídos de plantas. Assim, é de grande relevância o estudo dos monoterpenos, moléculas constituintes de cerca de 90% dos óleos essenciais extraídos de plantas e possuem numerosas propriedades farmacológicas dentre as quais se incluem a antimicrobiana, antioxidante, anestésica e anti-hipertensiva (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

A R(+)-pulegona, R(+)-2-isopropil-5 metil-cicloexanona, é um monoterpeno que apresenta atividade antiespasmódica em íleo de ratos (SOARES, *et. al.*; 2010) e efeito relaxante no músculo liso arterial (GUEDES *et.al.* 2004), bem como, no uterino (SOUZA, *et al.*,1997). Esta substância representa 80% da constituição total da *Mentha pulegium* e apresenta, ainda, efeito inotrópico negativo, ou seja, diminui a força de contração, a velocidade de desenvolvimento de pressão pelo miocárdio e a velocidade de ejeção, proporcionada pelo bloqueio dos canais para Ca^{2+} do tipo L, investigados em cardiomiócitos (DE CERQUERA. *et al.* 2011).

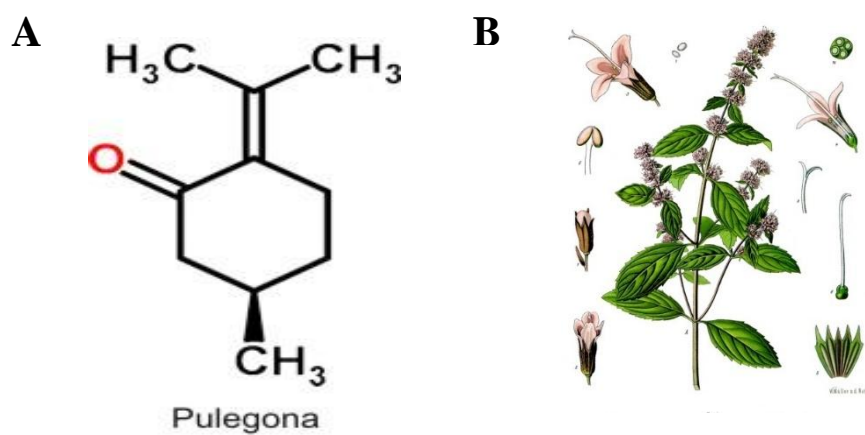


Figura 1: A- Fórmula estrutural da pulegona, (R)- 2- isopropil-5 metil-cicloexanona(Marx e Normam, 1975). B- Ilustração da *Mentha x piperita* L. (1887 - Köhlers; Medicinal Plants)

2. Objetivos

2.1. *Objetivo Geral:*

Identificar a atividade vasorrelaxante independente de endotélio induzida por R(+)-pulegona em aorta torácica em ratos normotensos.

2.2. *Objetivos específicos:*

- ❖ Identificar a ação de R(+)-pulegona sobre os canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP});
- ❖ Analisar a participação dos canais para potássio sensíveis ao cálcio de grande condutância (BK_{Ca}^{2+}) no vasorrelaxamento promovido por R(+)-pulegona;
- ❖ Analisar a participação dos canais para potássio sensíveis a voltagem (K_v) no efeito vasorrelaxante de R(+)-pulegona.

3. Materiais e métodos

3.1. Animais

Ratos machos *Wistar* (250-300 g) provenientes do Biotério Setorial do DFS foram utilizados nos experimentos. Os animais foram mantidos em sob condições controladas de temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) e do ciclo de iluminação (luzes acesas de 06:00 – 18:00 horas) e tiveram livre acesso a ração para roedores e água filtrada.

Os procedimentos experimentais realizados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UFS sob protocolo #04/2015, os quais estão de acordo com a Lei 11.794 e Diretriz Brasileira de Prática para Cuidado e Utilização de Animais para Fins Científicos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2. Substâncias

Cloridrato de L(-)-fenilefrina (FEN), Cloridrato de acetilcolina (ACh), tetraetilamônio (TEA), 4-aminopiridina (4-AP) e glibenclamida (Glib), foram obtidos da Sigma/Aldrich.

3.3. *Soluções.* A composição da solução de Krebs (em mmol/L): NaCl 118.0 (Dinâmica); KCl 4.6 (EEL); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5 (Neon); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.7 (Berzog); NaHCO_3 25.0 (Merck); $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.1 (Berzog); e Glicose 11 (Merck) (NG *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2013).

3.4. Substância natural utilizada

Realizou-se todos os experimentos aqui apresentados com a R(+)-pulegona (Sigma/Aldrich, cat #376388) a qual foi solubilizada em cremofor (1% por mL de solução) e posteriormente diluída com água destilada até que se atingisse a concentração de 1 mmol/L. A concentração de cremofor não ultrapassou 0,01% (v/v) nos

experimentos realizados, assim, o não houveram efeitos contráteis ou relaxantes nos anéis de aorta evocados pela presença desta substância.

3.5. Preparação de anéis da aorta isolados

O segmento torácico da aorta foi removido do rato e limpo, retirando todo tecido conjuntivo e gordura presente no mesmo. Anéis de 2-3 mm foram obtidos cortando-se este segmento, em alguns dos anéis removeu-se o endotélio vascular para as investigações da atividade da substância com o auxílio de hastes metálicas. Os anéis fixados em hastes foram imersos em 10 mL de solução de KREBS em banho para órgão isolado (37°C e aerados em mistura carbogênica de 95% O₂ e 5% CO₂).

3.6. Estabilização e verificação de endotélio.

Os anéis foram estabilizados durante uma hora aplicando-se a tensão de 1,0 g em intervalos regulares de 15 minutos. Após o período de estabilização os anéis de aorta foram pré-contráídos com FEN (1µmol/L), agonista α 1 adrenérgico (BÜSCHER et al., 1999), e quando foi atingido o platô da contração (componente tônico) adicionou-se Ach (1µmol/L), agonista muscarínico para ativar receptores do tipo M3 presentes nas células endoteliais (REN; NAKANE; CHIBA, 1993). Os anéis com endotélio foram considerados viáveis quando se obtinha a porcentagem de relaxamento igual ou superior a 80%.

3.7. Investigação da atividade vasorrelaxante de R(+)-pulegona.

Para investigar a atividade vasorrelaxante de R(+)-pulegona os anéis contendo ou não endotélio funcional foram submetidos uma pré contração induzida por FEN ou solução de KCl 60 mmol/L, que promove a despolarização da membrana plasmática. No componente tônico da contração, concentrações crescentes de R(+)-pulegona (10^{-8} - 3×10^{-3} M), foram adicionadas as preparações.

3.8. Investigação do envolvimento dos canais de potássio no vasorelaxamento.

Após a verificação do endotélio vascular, bloqueadores de canais para potássio foram pré-encubados durante 30 minutos:

- ❖ TEA 3 mmol/L, bloqueador inespecífico dos canais para potássio (QUAYLE; NELSON; STANDEN, 1997);
- ❖ TEA 1mmol/L, bloqueador dos canais $BK_{Ca^{2+}}$, (WHITE et al., 2002);
- ❖ 4- AP 1 mmol/L, bloqueador de canais K_V , (BERG, 2002);
- ❖ GLIB 10^{-5} mmol/L, bloqueador de K_{ATP} , (WICHA et al., 2015; NELSON; QUAYLE, 1995)

Após os 30 minutos foram administradas concentrações crescentes de R(+)-pulegona (10^{-5} - 3×10^{-3}) e foram observadas as alterações frente ao relaxamento provocado pela substância.

3.9. Análise de dados.

Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m). As curvas foram obtidas por meio da regressão não-linear, a partir da qual obteve-se também os valores de pD2 e efeito máximo (Emáx). O teste *t* de *Student* foi utilizado para as análises dos dados e os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Todos os dados foram plotados e analisados no *GraphPad PrismTM* 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4. Resultados

4.1. Resposta vasorrelaxante de anéis de aorta com e sem endotélio induzida por R(+)-pulegona.

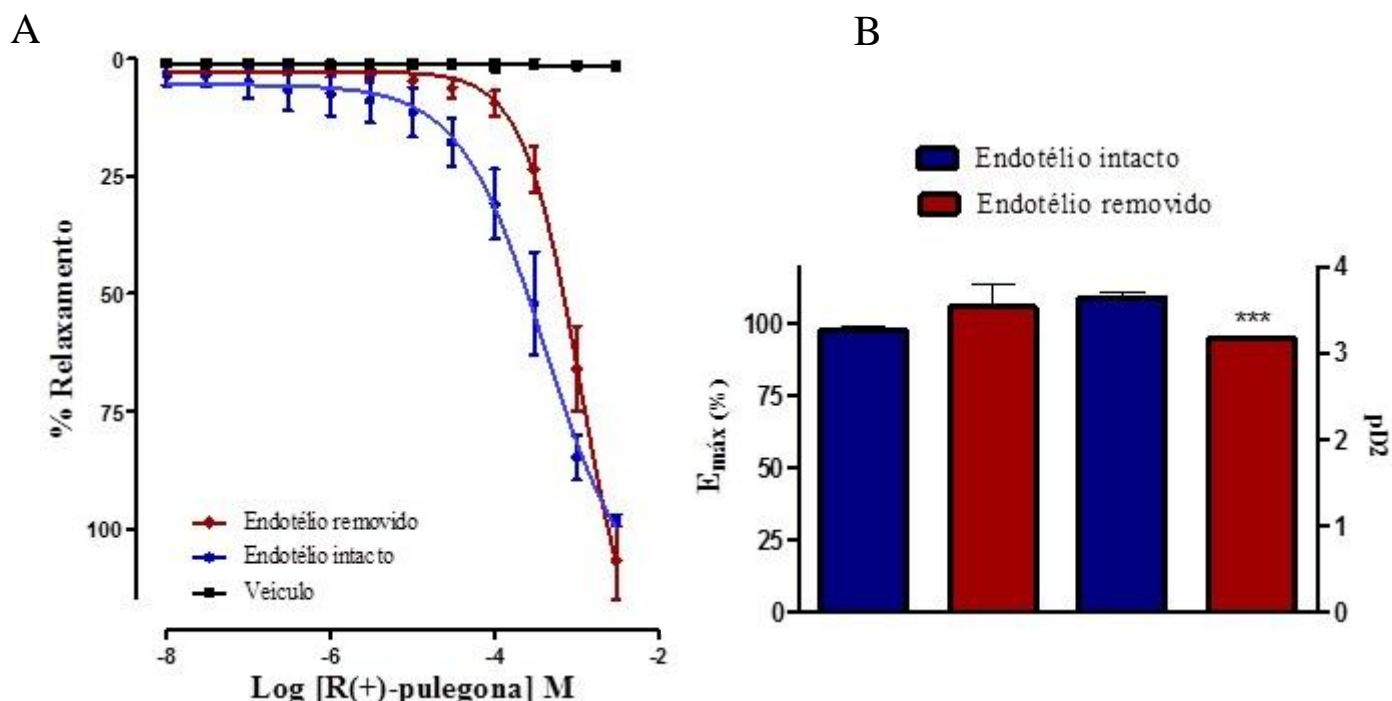


Figura 2: Resposta vasorrelaxante induzido por R(+)-pulegona em anéis de aorta torácica com endotélio intacto e com endotélio removido. Em A, curvas de concentração-resposta que demonstram o efeito da substância (10^{-8} – 3×10^{-3} M) na presença (●) e na ausência do endotélio vascular (♦). À direita, gráfico em barras representando o efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$ em %) e o valor do pD_2 . Valores expressos como média \pm e.p.m, $n=5$ e $n=6$, respectivamente. Teste t-Student - *** $p<0,001$

A figura 2 apresenta o gráfico de relaxamento, concentração resposta em anéis com e sem endotélio vascular. Observa-se que R(+)-pulegona apresenta um deslocamento da curva de vasorrelaxamento para à esquerda na presença do endotélio. Além disso, a substância apresenta atividade independente do endotélio.

4.2. Resposta vasorrelaxante de R(+)-pulegona induzido pela ativação canais inespecíficos

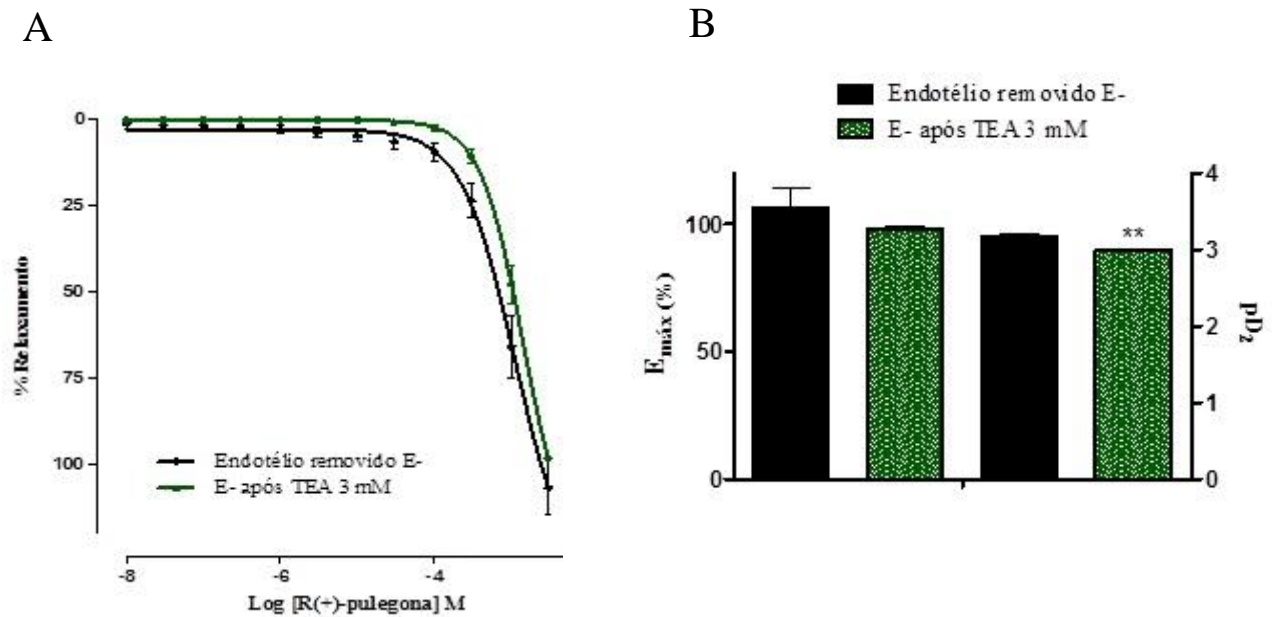


Figura 3: Modulação da resposta vasorrelaxante da R(+)-pulegona em anéis de aorta, com endotélio removido, por bloqueio inespecífico de canais de potássio com TEA 3 mM. Em A, curvas de concentração-resposta para R(+)-pulegona na ausência do bloqueador (●) e com o bloqueador (■). Em B pD₂ e E_{máx} da substância em anéis na presença e na ausência do bloqueador. Os valores expressos como média ± e.p.m. Test t de Student *p<0,5.

A participação dos canais para potássio foi investigada com a utilização de TEA (3 mM). Na situação controle observa-se a atividade da substância na ausência desse bloqueador e na comparação desta atividade em anéis na presença do TEA, observa-se um deslocamento da curva de relaxamento, aumento do valor do pD₂ (pD₂=3,007 ± 0,013), sem nenhuma alteração no efeito máximo.

4.3. Resposta vasorrelaxante de R(+)-pulegona sobre os canais para potássio sensíveis ao cálcio de grande condutância (BK_{Ca}^{2+}).

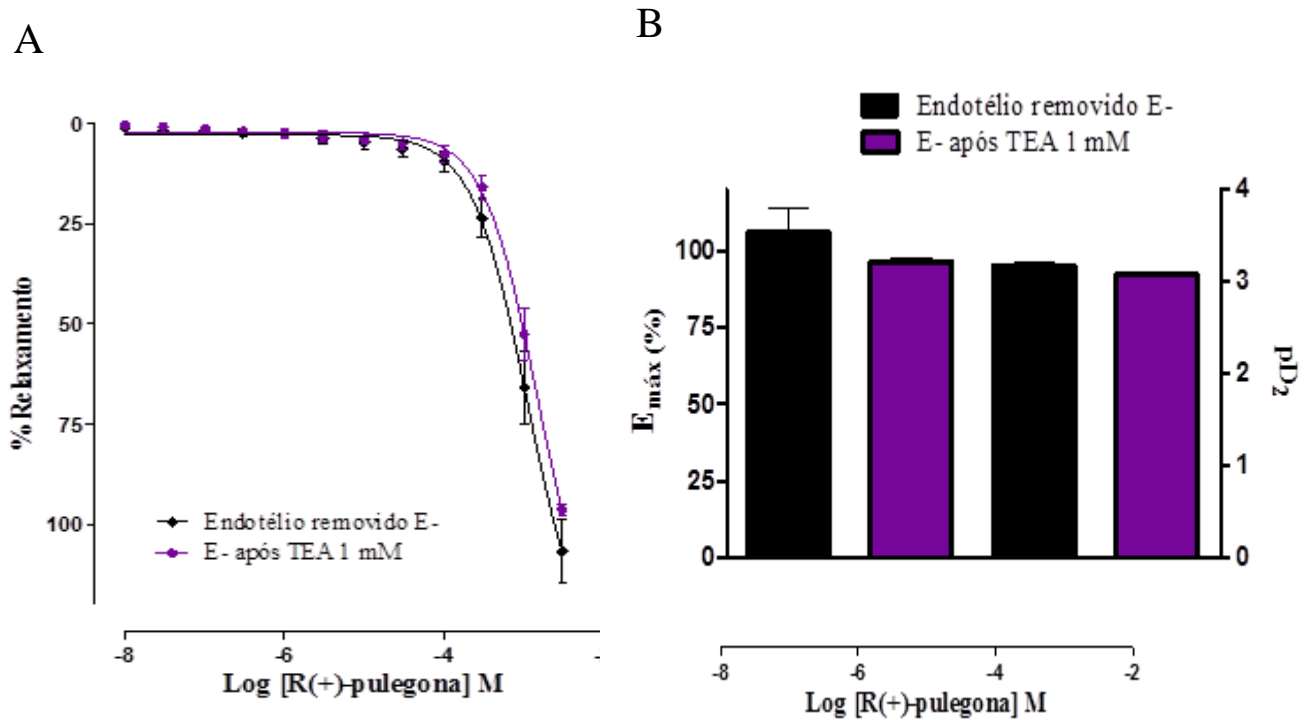


Figura. 4. Modulação da resposta relaxante de R(+)-pulegona pelo bloqueio dos canais para potássio sensíveis ao cálcio de grande condutância com 1 mM de TEA. Em A, curvas de concentração-resposta na presença (●) e na ausência do bloqueador (◆). Em B, gráfico em barras evidenciando o valor do pD_2 e $E_{m\acute{a}x}$ para pulegona na presença e na ausência do bloqueador. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$

Na figura 4 temos um gráfico de vasorrelaxamento de anéis controle e de anéis com TEA 1Mm, o qual é um bloqueador específico BK_{Ca}^{2+} . Não houve nenhuma alteração na atividade da substância na presença do bloqueador

4.4. Resposta vasorrelaxante de R(+)- pulegona sobre os canais para potássio sensíveis ao ATP.

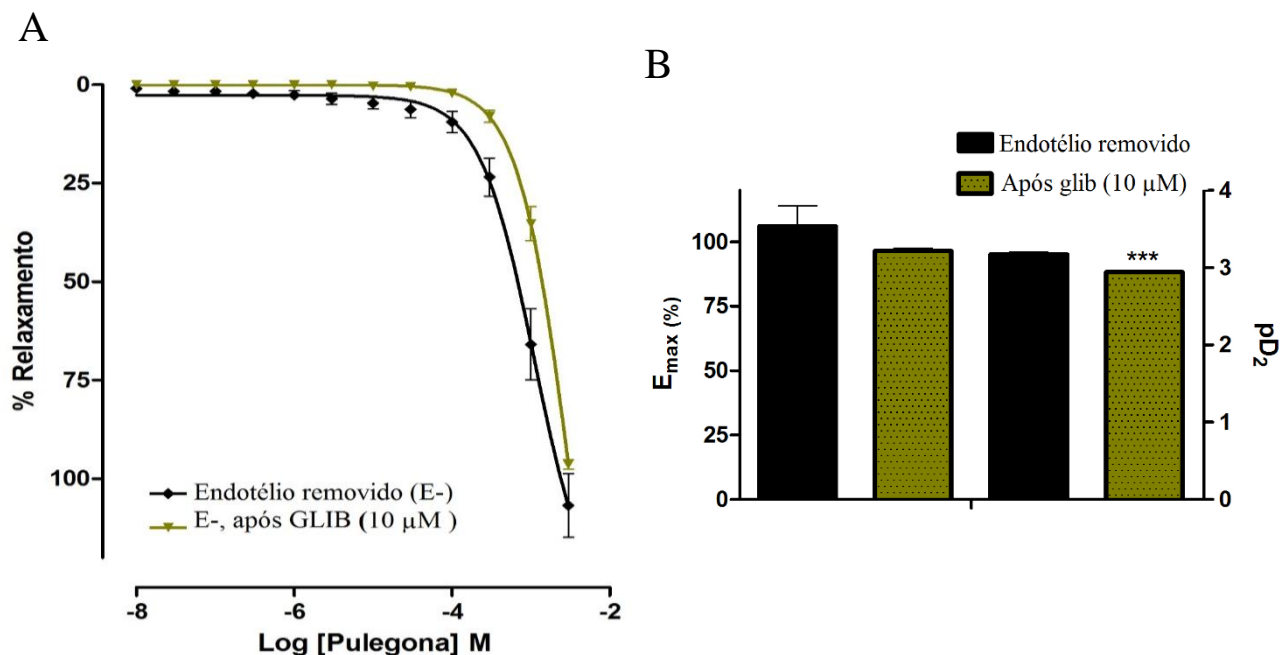


Figura. 5. Modulação da resposta relaxante de R(+)-pulegona pelo bloqueio dos canais para potássio sensíveis ao ATP com 10^{-5} mM de glibenclamide (GLIB). Em A, curvas de concentração-resposta na presença (\blacktriangledown) e na ausência do bloqueador (\blacklozenge). Em B, gráfico em barras evidenciando o valor do pD_2 e $E_{máx}$ para pulegona na presença e na ausência do bloqueador. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m.

Na figura 5 observamos um gráfico de relaxamento em anéis de aorta submetidos ao bloqueador de canais para potássio sensíveis ao ATP. Percebemos o deslocamento da curva para à direita na presença do bloqueador em relação à curva controle: (pD_2 -2,94 \pm 0,012 vs controle -3,17 \pm 0,03 n=6), interpretamos como uma inibição da resposta de R(+)-pulegona, mas sem diferença no efeito máximo($E_{máx}$. 96,2 \pm 1,2% vs controle 106 \pm 8,1% n=6).

4.5. Resposta vasorrelaxante de R(+)- pulegona sobre os canais para potássio sensíveis à voltagem.

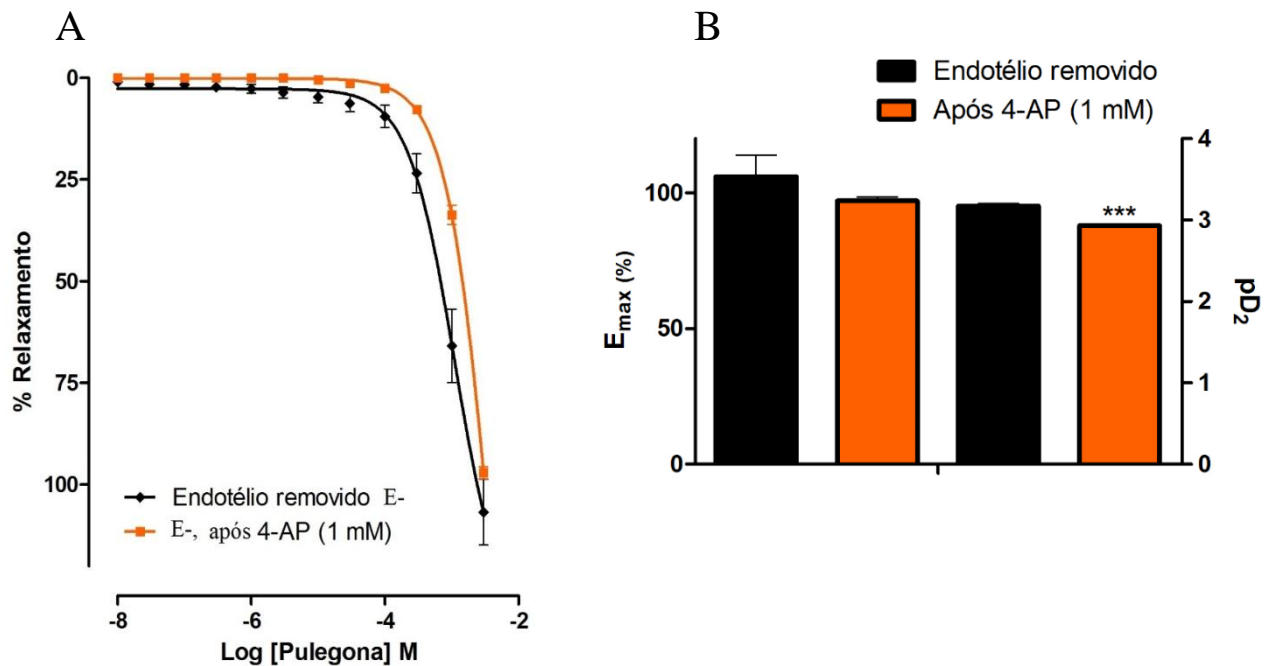


Figura. 6 Modulação da resposta relaxante de R(+)-pulegona pelo bloqueio dos canais para potássio sensíveis à voltagem com 1 mM de (4-AP). Em A, curvas de concentração-resposta na presença (■) e na ausência do bloqueador (◆). Em B, gráfico evidenciando os valores de pD₂ e E_{máx} para pulegona na presença e na ausência do bloqueador. Os valores foram expressos como média ± e.p.m. *p<0,001

Na figura 6 podemos perceber que há um deslocamento do traçado para direita da curva com 4-AP em relação com a curva controle pD₂ (-2,94 ± 0,012 vs controle - 3,17± 0,03), mas sem alterar o efeito máximo (E_{máx} 97,1± 1,5% vs controle 106±8,1% n=6).

5. Discussão

Algumas plantas medicinais produzem substâncias aromáticas que possuem diversos benefícios, dentre eles, a atividade antineoplásica, antibacteriana, antifúngica, antiviral, bem como a ação hipotensora (EDRIS, 2007). O principal constituinte dos óleos essenciais são os monoterpenos, os quais são provenientes do metabolismo secundário das plantas, sendo sintetizados e armazenados em tricomas glandulares, os quais são protuberâncias foliares (McCASKILL, *et al.*, 1992). A pulegona é um exemplo de monoterpeno cetônico proveniente da *Mentha piperita* L. e por desviar da luz plano polarizada, pode ser encontrada na forma de S(-)-pulegona e R(+)-pulegona, sendo esta última, em maior quantidade. Apesar dos diversos efeitos benéficos citados, já foi descrito que, em altas concentrações a R(+)-pulegona produz efeito hepatotóxico (ENGEL, 2003).

A atividade hipotensora dos monoterpenos pode ser evidenciada de acordo com inúmeros estudos, como demonstrado por Dantas (2015), no qual o monoterpeno carvacrol induziu uma resposta independente de endotélio e se teve principalmente a inibição do influxo de íons cálcio (Ca^{2+}), impedindo assim a vasoconstrição. Machado (2014), estudou uma substância sintetizada a partir do componente majoritário do óleo de rícino, e identificou que esta ela produzia efeito hipotensor e bradicárdico a partir da doação de óxido nítrico.

Um estudo desenvolvido por Lima *et al.* (2012) demonstrou a importância da posição da ligação cetônica na avaliação da atividade vasorrelaxante em artéria mesentérica de ratos normotensos, indicando a relação entre estrutura e a atividade. Ainda neste estudo foi evidenciado a potencialização da atividade vasodilatadora de (+)-pulegona devido sua metabolização, originando metabólitos ativos. No entanto, não foi proposto nenhum tipo de mecanismo de ação possível.

Silva-Filho, *et al.* (2011) realizou um estudo com Borneol, verificando o aparato contrátil das células musculares lisas vasculares (CMLV) a partir dos canais para cálcio e os canais para potássio. Descobriu então que a resposta hipotensora do borneol se deu pelo bloqueio dos canais para cálcio, impedindo o influxo desses íons e, por conseguinte impedindo a despolarização celular, bem como ativou os canais para potássio, estimulando o efluxo de tais íons e promovendo a hiperpolarização celular.

Existem diversos tipos de canais para potássio, os quais são estimulados por diferentes tipos de moléculas sinalizadoras ou até mesmo pela diferença de potencial existente na membrana. A atividade proveniente destes canais é de suma importância para a manutenção do tônus vascular (SOBEY, 2000). O estudo de substâncias que atuem nesses canais é um caminho para a descoberta de substâncias anti-hipertensivas.

No presente estudo foi estudada a atividade de R (+) - pulegona em anéis de aorta em ratos normotensos na presença e na ausência de endotélio. Percebeu-se então um deslocamento para a esquerda, evidenciando que o endotélio promoveu a potencialização da atividade vasorrelaxante (fig.2). Há, portanto, a ativação de receptores presentes no endotélio liberando substâncias que são vasodilatadoras derivadas do endotélio, tais como EDHF e óxido nítrico.

O TEA 3 mM é um bloqueador inespecífico dos canais de potássio presentes na membrana (QUAYLE; NELSON; STANDEN, 1997), dessa maneira, pela fig.3, percebemos um deslocamento para direita em relação ao controle corroborando que pulegona tem o seu efeito relaxante mediado por canais de potássio. No entanto, o efeito máximo não difere entre os anéis da aorta torácica controle e os pré-encubados com TEA 3mM, percebe-se então que o efeito vasorelaxante da pulegona sofre influências de outros canais e substâncias vasodilatadoras, tais como óxido nítrico e EDHF. Kang e Seol (2015), ao estudarem o linalol, perceberam que este monoterpene auxiliava na hiperpolarização vascular por meio da ativação de canais para potássio e permitindo o efluxo deste íon, bem como ocorreu com R(+)-pulegona.

O TEA 1mM (fig. 4), nesta concentração é um bloqueador específico para canais de potássio sensíveis a cálcio de grande condutância (BK_{Ca}) presentes na membrana, não percebemos o deslocamento para direita significativo, desta maneira, compreende-se que os canais BK_{Ca} não participa do efeito vasorrelaxante da substância (WHITE et al., 2002). Esse resultado, diverge do proposto por Silva *et al.* (2011) ao estudar o monoterpene rotundifolona.

A 4- AP 1 mM (4- amino-piridina), fig.5, é um bloqueador específico para os canais de potássio sensíveis a variações de voltagem na membrana (K_V), (BERG, 2002) e a glibenclamida 10^{-5} (WICHA et al., 2015; NELSON; QUAYLE, 1995), fig. 6, é um bloqueador específico de canais de potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}), percebe-se que ambos apresentam um deslocamento para direita em relação ao controle ratificando que

a pulegona tem seu efeito relaxante mediado por canais de potássio do tipo K_v e K_{ATP} . Silva-Filho, *et al* (2011), ao estudar o borneol percebeu que a atividade hipotensora dependente do efluxo de potássio era proveniente dos K_v s e dos K_{ATP} s, resultado semelhante ao apresentado por Peixoto-Neves (2009) ao avaliar a atividade de dos isômeros fenólicos carvacrol e timol.

6. Conclusão

R(+)-pulegona promove a atividade vasorelaxante, independentemente do endotélio vascular mediante a ativação de canais de potássio, aumentando o efluxo deste íon, favorecendo a hiperpolarização das células musculares lisas vasculares.

7. Referências

- BERG, T. Analysis of the pressor response to the K⁺ channel inhibitor 4-aminopyridine. *European journal of pharmacology*, v. 452, n. 3, p. 325–37, 11 out. 2002.
- BÜSCHER, R. *et al.* Variability in FENnylephrine response and essential hypertension: a search for human alpha(1B)-adrenergic receptor polymorphisms. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, v. 291, n. 2, p. 793–8, nov. 1999.
- DANTAS, B. P. V. *et al.* Participation of the TRP channel in the cardiovascular effects induced by carvacrol in normotensive rat. *Vascular pharmacology*, v. 67-69, p. 48–58, jan, 2015
- DE CERQUEIRA, S.V.S.; GONDIM, A.N.S.; ROMAN-CAMPOS, D., CRUZ, J.S.; PASSOS, A.G.D.; LAUTON-SANTOS, S.; LARA, A. GUATIMOSIM, S.; CONDE-GARCIA, E.A.;DE OLIVEIRA, E.D;DE VASCONCELOS, C.M.L.,R (+) - pulegone impairs Ca²⁺ homeostasis and causes negative inotropism in mammalian myocardium. *Eur. J. Pharmacol.* 672, 135-142, 2011.
- EDRIS, A.E., Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Phytother. Res.* 21, 308-323 (2007).
- ENGEL, W., In vivo Studies on the Metabolism of the Monoterpene Pulegone in Humans Using the Metabolism of Ingestion-Related Amounts (MICA) Approach: Explanation for the Toxicity Differences between (S)-(-) and R-(+)- Pulegone. *J. Agric Food Chem*, 5, 6568-6597, 2003.
- GUEDES, D.N., SILVA, D.F., BARBOSA-FILHO, J.M., de MEDEIROS, I.A., 2004. Endothelium dependent hypotensive and vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Mentha villosa* in rats. *Phytomedicine* 11, 490-497.
- GUIMARÃES *et al.* Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of Carvacrol. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 107, 949-957 (2010).

KANG, P.; SEOL, G. H. Linalool elicits vasorelaxation of mouse aortae through activation of guanylyl cyclase and K(+) channels. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, v. 67, n. 5, p. 714–9, maio 2015

LIMA, T. C *et al.* Structural relationships and vasorelaxant activity of monoterpenes. *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, v. 20, n. 1, p. 23, 2012.

MACCASKILL, D.; GERSHENZON, J.; CROTEAU, R.; Morphology and monoterpene biosynthetic capabilities of secretory cell clusters isolated from glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita* L.) *Planta*, 187:445-454 (1992).

MACHADO, N. T. *et al.* Nitric oxide as a target for the hypotensive and vasorelaxing effects induced by (Z)-ethyl 12-nitrooxy-octadec-9-enoate in rats. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, v. 62, p. 317–25, 1 out. 2014.

NG, H.K. *et al.* Potassium channel openers and prostacyclin play a crucial role in mediating the vasorelaxant activity of *Gynura procumbens*. *BMC complementary and alternative medicine*, v. 13, p. 188, jan. 2013.

PASSOS, V.M.A; ASSIS, T.D.; BARRETO, S.M.; *Hypertension in Brazil: estimates from population-based prevalence studies*; Epidemiol. Serv. Saúde v.15 n.1 Brasília mar.2006

PEIXOTO-NEVES, D. *et al.* Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundamental & clinical pharmacology*, v. 24, n. 3, p. 341–50, jun. 2010.

QUAYLE, J. M.; NELSON, M. T.; STANDEN, N. B. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiological reviews*, v. 77, n. 4, p. 1165–232, out. 1997.

REN, L. M.; NAKANE, T.; CHIBA, S. Muscarinic receptor subtypes mediating vasodilation and vasoconstriction in isolated, perfused simian coronary arteries. *Journal of cardiovascular pharmacology*, v. 22, n. 6, p. 841–6, dez. 1993.

RIBEIRO, L.A.A; TAVARES,J.F; ANDRADE, N.C.; SILVA, M.S.; SILVA, B.A.; Vasorelaxant effect of 8(17), 12E,14-labdatrien-18-oic acid (Labdane-302) in rat aorta involves K⁺ channels. *Rev Bras Farmacogn*, 2007, vol 17, 197-203.

SILVA, D.F. et al. Rotundifolone induced relaxation is mediated by BKCa channels activation and CaV channels inactivation. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, v.109, n.6, p. 465-75, 2011.

SILVA-FILHO, J.C. et al. Investigation of mechanisms involved in (-)-borneol induced vasorelaxant response on rat thoracic aorta. *Basic e Clinical Pharmacology and Toxicology*, v. 110, n. 2, p. 171-7, 2012

SOARES, P.M., ASSUREUY, A.M., SOUZA, E.P., LIMA, R.F, T.O., FONTENELE, S.R., CRIDDLE,D.N., 2005. Inhibitory effects of the essential oil of *Mentha pulegium* on the isolated rat myometrium. *Planta Med.* 71,214-218.

SOBEY,C. G, Potassium Function in Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 21:28-38; 2001

SBH, Sociedade Brasileira de Hipertensão. Disponível em :<

<http://www.sbh.org.br/geral/geral.asp>> Acesso em: 04/01/2016

SOUZA,A.A.S.,SOARES,P.M.G.,ALMEIDA,A.N.S.,MAIA, A.R.,SOUZA,E.P.,ASSREUY, A.M.S, 2010. Antispasmodic effect of *Mentha piperita* essential oil on tracheal smooth muscle of rats. *J. Ethanopharmacol.* 130, 433-436.

WICHA, P. *et al.* Ethyl rosmarinate relaxes rat aorta by an endothelium-independent pathway. *European journal of pharmacology*, v. 766, p. 9–15, 5 nov. 2015

WHITE, R. E., et al. Endothelium independent effects of estrogen on Ca-activated K channels in human coronary artery smooth muscle cells. *Cardiovascular Research*, v. 53, n. 2, p.650-661, 2002

ZHU, J. *et al.* Effects of Shenfu injection and its main components on the contraction of isolated rat thoracic aortic rings. *PloS one*, v. 8, n. 10, p. e78026, jan. 2013.